

ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИГНАНСОДЕРЖАЩЕГО ЭКСТРАКТА ИЗ СЕМЯН ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

This article is devoted to the isolation of lignan-containing fractions from flaxseed. The main component of these fractions is lignan secoisolariciresinol diglucoside (SDG). The authors have worked out the efficient rapid extraction method of receiving of lignan-containing fractions from flaxseed with the satisfactory content of SDG. This method was realized using of ecological safe solvents by microwave-assisted extraction.

Интенсивное использование природных и синтетических биологически активных веществ в качестве основы для создания профилактических и лекарственных препаратов обуславливает динамичный поиск новых природных соединений и изучение их активности [1, 2]. С этой точки зрения большой интерес представляют лигнаны. Это обширная группа природных фенольных соединений, обладающая широким спектром биологической активности и содержащаяся в различных органах некоторых растений. Особенно богаты лигнанами семена льна масличного (*Linum usitatissimum*). Лигнан (+)-[2*R*,2'*R*]-бис[(4-гидрокси-3-метоксифенил)-метил]-1,4-бутандиол-бис(β-глюкопиранозид), или секоизоларицирезинола диглюкозид (СДГ) (рис. 1), в наибольшем количестве по сравнению с другими минорными лигнанами содержится в семенах льна [1].

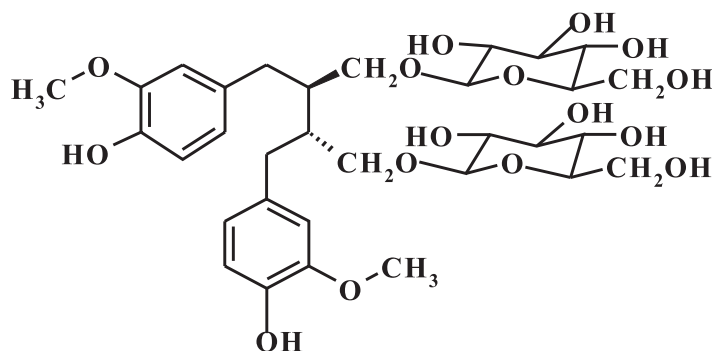


Рис. 1. Структура секоизоларицирезинола диглюкозида (СДГ) [1]

В семенах некоторых сортов льна масличного удельное содержание СДГ составляет 1÷2 %, тогда как в семенах сои и зерновых культур его уровень не превышает 0,002 и 0,001 % соответственно [3]. Секоизоларицирезинола диглюкозид обладает мощным антиоксидантным потенциалом за счет наличия в его структуре агликоновой части, схожей со структурой ранее описанного антиоксиданта нордигидрогуаретовой кислоты [4].

Уникальные биологически активные свойства СДГ делают актуальным получение обогащенных лигнаном экстрактов и выделение этого соединения в чистом виде. Эти субстанции могут выступать основой новых лекарственных препаратов и применяться для получения модифицированных производных СДГ.

Наиболее эффективным методом выделения природных соединений из растительного сырья, в том числе и СДГ, является экстракционный способ, заключающийся в переводе веществ из растительного материала в раствор соответствующим растворителем. Если соединение присутствует в растительном сырье в виде мономера биополимера, то для его высвобождения из связанного состояния необходимо прибегнуть к гидролизу.

Цель данной работы – разработка эффективного способа получения СДГ путем оптимизации процесса гидролиза и экстракции из семян льна масличного с использованием экологически безопасных растворителей.

Материал и методика

В качестве материала для выделения СДГ были взяты семена льна масличного сорта Gold Flax. Льняное семя массой 16 г измельчали в электрической кофемолке, просеивали через сито с диаметром ячейки 1 мм и обезжиривали гексаном в течение 4 ч в аппарате Сокслета. Полученную массу разделяли на три равные части по 4 г каждая, которые использовали затем для разработки трех методов получения СДГ-содержащего экстракта.

К первой порции добавляли 80 мл 50 % водного этанола. Полученную суспензию трехкратно обрабатывали микроволновым излучением мощностью 150 Вт в течение 2 мин с перерывом в 1 мин, затем к экстракционной системе добавляли еще 3,2 мл 4 М водного раствора NaOH. Полученную суспензию окончательно обрабатывали микроволновым излучением в описанном режиме.

Ко второй порции обезжиренных семян льна приливали 80 мл 50 % водного этанола и 3,2 мл 4 М водного раствора NaOH, суспензию шестикратно подвергали обработке микроволновым излучением мощностью 150 Вт в течение 2 мин с перерывом в 1 мин.

К третьей порции обезжиренного льняного семени добавляли 83,2 мл 0,3 М водного раствора NaOH и полученную суспензию шестикратно обрабатывали микроволновым излучением мощностью 150 Вт в течение 2 мин с перерывом в 1 мин.

Центрифугированием экстрагируемых суспензий получали супернатанты, которые подкисляли до $\text{pH}=3\div 4$ М раствором HCl и упаривали на роторном испарителе при пониженном давлении при температуре, не превышающей 45 °С.

Качественный анализ состава полученных экстрактов осуществляли методом ТСХ на пластинах «Kieselgel 60 F₂₅₄» (Merck, США). В качестве подвижной фазы использовали систему вода : пропанол-2 : водный аммиак (1:8:1). При УФ-облучении пластин фиксировали специфическую бриллиантовосинюю флуоресценцию пятна, принадлежащего СДГ, что дало возможность четко идентифицировать данный лигнан в полученных смесях.

Количественно СДГ в экстрактах определяли методом ВЭЖХ при помощи хромато-масс-спектрометра «Waters Micromass ZQ 2000» (Waters, США) с использованием колонки BDS HYPERSIL C₁₈ 250×4,6 мм. Детекцию осуществляли диодно-матричным детектором при длине волны 280 нм и масс-детектором с ионизацией электрораспылением. Элюирование проводили в линейном градиенте с помощью системы, состоящей из ацетонитрила (раствор А) и воды с 0,1 % содержанием муравьиной кислоты (раствор Б) (А:Б: 30:70, 0÷5 мин; 70:30, 20÷30 мин и 100:0, 50÷65 мин) со скоростью потока 0,7 мл/мин [5].

Результаты и их обсуждение

Традиционно общая схема выделения СДГ из семян льна масляного включает следующие стадии: измельчение семян, их обезжиривание, экстракция и гидролиз обезжиренной массы, нейтрализация и концентрирование полученного экстракта [3, 6–8].

Обезжиривание гексаном необходимо для удаления липидов и облегчения процесса экстракции фенольных компонентов льняного семени. Наиболее важными стадиями являются гидролиз и экстракция, так как именно они определяют выход экстрактивных веществ, в которые входит СДГ. Проведение гидролиза обязательно, так как секоизоларицирезинола диглюкозид находится в связанном олигомерном состоянии вместе с гидроксиметилглутаровой кислотой в льняном семени. Для высвобождения СДГ из связанного состояния применяют различные методы гидролиза: кислотный, ферментативный и щелочной. При использовании кислоты в качестве гидролизующего агента из растительного материала высвобождается лишь малая часть секоизоларицирезинола диглюкозида, так как его большая часть превращается в секоизоларицирезинол, который последовательно дегидратируется в ангидросекоизоларицирезинол [9]. В исследованиях с применением ферментативного гидролиза при помощи β -глюкоронидазы (К.Ф.3.2.1.31) [10] достигается незначительный выход СДГ (817 мг/кг льняного семени) [11], более того, это достаточно дорогой способ гидролиза по сравнению с кислотным и щелочным. Таким образом, наиболее эффективным способом проведения гидролиза является щелочной [3, 6–8].

В табл. 1 обобщены методики, в которых достигается наибольший выход СДГ в экстракте. Применение систем диоксан – этанол и метанол – вода позволяет получить в экстракте удовлетворительное содержание СДГ, но из-за высокой токсичности диоксана и метанола эти методы небезопасны для реализации [3, 6]. Поэтому в качестве экстрагента был взят наиболее экологически безопасный растворитель – водный этанол, кроме того, водно-спиртовая система дает возможность избавиться уже на стадии экстракции от нежелательных цианогенных гликозидов, присутствующих в льняном семени [7].

Способ экстракции, в котором в качестве экстрагента используется водная щелочь, позволяет получать фракции с высоким содержанием СДГ [8]. Недостатки этого способа – большие затраты времени и растворителя по отношению к сырью, что также увеличивает продолжительность и энергоемкость процесса на стадии концентрировании экстракта [8].

Сравнение способов получения СДГ-содержащего экстракта

Соотношение количеств сырья и экстрагента, г/мл	Условия проведения процесса			Содержание СДГ в экстракте в расчете на обезжиренное сырье, мг/г	Источник в литературе
	Экстракция		Щелочной гидролиз (время, pH, температура процесса)		
	Параметры проведения (время, температура)	Экстрагирующий агент			
1 : 8	48 ч, 60 °С	Диоксан : 95 % водный этанол (1 : 1)	Водный NaOH, 48 ч, pH = 10, 25 °С	11,7	[3]
1 : 20	3 ч, 60 °С	Вода : метанол (3 : 7)	Водный NaOH, 3 ч, pH = 10, 25 °С	12,9	[6]
1 : 6	24 ч, 25 °С	Вода : этанол (3 : 7)	Водный NaOH, 4 ч, pH = 10, 50 °С	20,0	[7]
1 : 50	Водный NaOH, 1 ч, pH = 10, 25 °С			11,8	[8]

Особый интерес с точки зрения решения проблемы повышения эффективности экстракции биологически активных веществ из растительного сырья представляют методы с использованием микроволнового излучения [12]. Они дают возможность сократить расход экстрагента, а также продолжи-

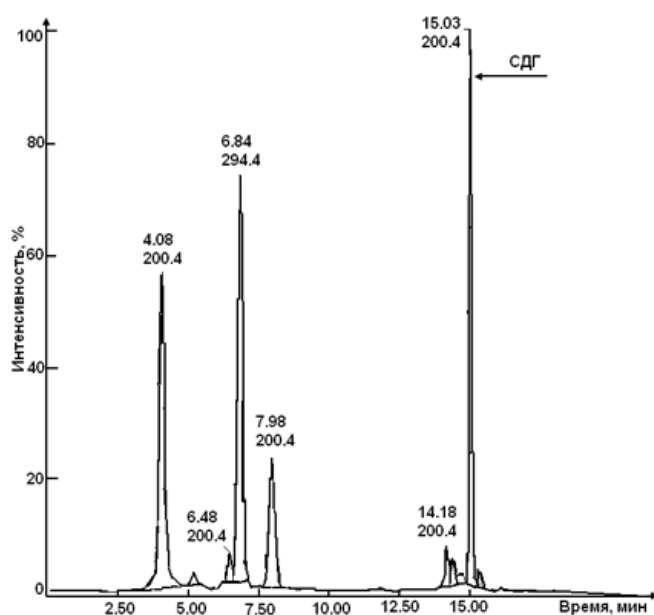


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограмма лигнансодержащего экстракта

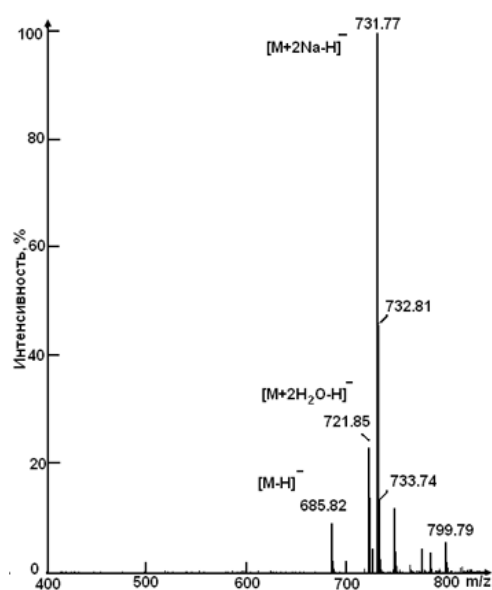


Рис. 3. Масс-спектры СДГ в области отрицательных ионов

тельность процесса за счет быстрого нагрева, разрыхления межмолекулярных связей полимеров и соответственно большей доступности компонентов экстрагируемого материала растворителю [13]. Несмотря на то что СДГ достаточно термостабилен при кратковременном воздействии температуры [14], его выход значительно снижается при продолжительном времени проведения микроволнового воздействия из-за процессов каталитической деструкции, имеющих место в растительном материале [15], поэтому наиболее оптимальным способом микроволновой обработки является кратковременное микроволновое воздействие [13].

Ранее было показано, что необходимое соотношение растительного сырья и экстрагента для эффективной экстракции СДГ в раствор составляет 1:20 [16].

В соответствии с приведенным анализом методов выделения СДГ (см. табл. 1) нами были предложены и апробированы три способа получения СДГ-содержащего экстракта.

Секоизоларицирезинола диглюкозид в экстрактах, полученных тремя способами, идентифицировали с помощью метода ВЭЖХ по веществу со временем удерживания 15,03 мин (рис. 2), которое совпадало со временем удерживания коммерческого препарата СДГ. Максимум поглощения для этого вещества в УФ-спектре наблюдается при 228,60 и 280,45 нм, что обусловливается наличием в его структуре гидрокси- и метоксизамещенного бензольного кольца [1, 5, 6].

При проведении ВЭЖХ-анализа детекция осуществлялась диодно-матричным детектором и масс-детектором с ионизацией электро-распылением. В масс-спектре, зарегистрированном в области отрицательных ионов (рис. 3), наблюдается сигнал с m/z 685,82, соответствующий иону $[M-H]^-$, для соединения с

молекулярной формулой $C_{32}H_{46}O_{16}$, т. е. СДГ. Наиболее интенсивные сигналы в масс-спектре положительных ионов принадлежат ионам с m/z 345,77 $[M-2Glu+H_2O+H]^+$, m/z 363,79 $[M-2Glu+2H_2O+H]^+$, m/z 327,77 $[M-2Glu+H]^+$, m/z 525,81 $[M-Glu+H_2O+H]^+$. Они генерируются путем отщепления одного или двух остатков глюкозы от молекулярного иона и присоединения к нему одной или двух молекул воды. Эти характеристики полученных масс-спектров соответствуют литературным данным [1, 16].

В результате проведения эксперимента было установлено, что выход экстракта с наибольшим содержанием в нем СДГ достигается при совмещении процессов гидролиза и экстракции водно-этанольной смесью, т. е. по второму способу (табл. 2). При проведении экстракции водным этанолом с последующим гидролизом по первому способу также получен экстракт с удовлетворительным содержанием СДГ. В случае экстракции водной щелочью по третьему способу получен экстракт с наименьшим содержанием СДГ, который отличался гелеобразной структурой из-за наличия большого числа других, перешедших в раствор соединений, что значительно затруднило процесс внесения пробы на стадии его хроматографического разделения.

Таблица 2

Влияние условий экстракции, гидролиза и микроволнового воздействия на содержание СДГ в экстрактах из семян льна масличного

Метод экстракции	Соотношение количеств сырья и экстрагента, г/мл	Условия проведения процесса				Выход экстрактивных веществ на обезжиренное сырье, %	Содержание СДГ в экстракте в расчете на обезжиренное сырье, мг/г
		Экстракция		Гидролиз			
		Время проведения опыта, мощность микроволнового излучения	Экстрагирующий агент	Гидролизующий агент	Время проведения опыта, мощность микроволнового излучения		
1	1:20	2 мин трехкратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт	50 % водный этанол	Водный NaOH, pH = 10	2 мин трехкратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт	20,6	9,7
Экстракция совместно с гидролизом							
2	1:20	Водный NaOH, 50 % водный этанол, pH = 10, 2 мин шестикратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт				23,2	14,2
3	1:20	Водный NaOH, pH = 10, 2 мин шестикратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт				18,8	7,9

Таким образом, выход СДГ при проведении экстракции, сопровождаемой микроволновым облучением, в большой степени зависит от концентрации этанола в воде. Этанол, как и вода, – хорошие экстрагенты для СДГ, тогда как вода является еще и отличным абсорбером микроволновой энергии. Более того, совместное проведение процесса экстракции и гидролиза обеспечивает эффективный переход СДГ в растворитель.

Можно сделать вывод, что наиболее эффективным и быстрым способом получения лигнансодержащего экстракта является способ, включающий стадию совмещенного процесса экстракции и гидролиза обезжиренного льняного семени при воздействии микроволнового излучения. Предложенный способ позволяет добиться высокого выхода экстрактивных веществ – 23,2 % с высоким содержанием в них СДГ – 14,2 мг/г в расчете на обезжиренное сырье.

1. Fritsche J., Angoelal R., Dachtler M. // J. Chromatogr. A. 2002. Vol. 972. P. 195.
2. Shadyro O.I., Glushonok G.K., Glushonok T.G. et al. // Free Radical Research. 2002. Vol. 36. P. 859.
3. Johnsson P., Kamal-Eldin A., Lundgren L.N., Aman P. // J. Agric. Food Chem. 2000. Vol. 48. P. 5216.
4. Kitts D.D., Yuan Y.V., Wijewickreme A.N., Thompson L.U. // Molecular and Cellular Biochem. 1999. Vol. 202. P. 91.
5. Coran S.A., Giannellini V., Bambagiotti-Alberti M. // J. Chromatogr. A. 2004. Vol. 1045. P. 217.
6. Madhusudhan B., Wiesenborn D., Schwarz J., Tostenson K., Gillespie J. // Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 2000. Vol. 33. P. 268.
7. Westcott N.D., Muir A.D. US 005705618A C07G 1/00, C08L 97/00 (1998).
8. Eliasson C., Kamal-Eldin A., Andersson R., Aman P. // J. Chromatogr. A. 2003. Vol. 1012. P. 151.
9. Charlet S., Bensaddek L., Raynaud S. et al. // Plant Physiol. Biochem. 2002. Vol. 40. P. 225.
10. Henrissat B., Bairoch A. // Biochem. J. 1996. Vol. 316. P. 695.
11. Obermeyer W.R., Musser S.M., Betz J.M. et al. // Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 1995. Vol. 208. P. 6.
12. Egizabal A., Zuloaga O., Etxebarria N. et al. // Analyst. 1998. Vol. 123. P. 1679.
13. Zang W., Xu S. // J. Sci. Food Agric. 2007. Vol. 87. P. 1455.
14. Westcott N.D., Muir A.D. // J. Agric. Food Chem. 2000. Vol. 48. P. 4048.
15. Letellier H., Budzinski H. // Analyst. 1999. Vol. 27. P. 259.
16. Zang W., Xu S. // J. Chromatogr. Sci. 2007. Vol. 45. P. 177.

Поступила в редакцию 30.01.09.

Ольга Викторовна Стасевич – аспирант кафедры органической химии БГТУ. Научные руководители – С.Г. Михаленок, В.П. Курченко.

Сергей Георгиевич Михаленок – кандидат химических наук, доцент кафедры органической химии БГТУ.

Владимир Петрович Курченко – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией прикладных проблем биохимии.